

E P

US

P C T

国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)
〔P C T 1 8 条、P C T 規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 F A P - 1 9 5 6	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(P C T / I S A / 2 2 0) 及び下記 5 を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 9 7 / 0 2 3 7 0	国際出願日 (日.月.年) 0 9 . 0 7 . 9 7	優先日 (日.月.年) 1 1 . 0 7 . 9 6
出願人(氏名又は名称) 湧永製薬株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(P C T 1 8 条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第 I 欄参照)。
2. ☐ 発明の単一性が欠如している(第 II 欄参照)。
3. ☒ この国際出願は、ヌクレオチド及び／又はアミノ酸配列リストを含んでおり、次の配列リストに基づき国際調査を行った。
 - ☒ この国際出願と共に提出されたもの
 - ☐ 出願人がこの国際出願とは別に提出したもの
 - ☐ しかし、出願時の国際出願の開示の範囲を越える事項を含まない旨を記載した書面が添付されていない
 - ☐ この国際調査機関が書換えたもの
4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条(P C T 規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。
6. 要約書とともに公表される図は、
 第 1 図とする。☒ 出願人が示したとおりである。☐ なし
☐ 出願人は図を示さなかった。
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl[°] C12Q1/68, C12N15/11

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl[°] C12Q1/68, C12N15/11

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

F-term BIOSIS WPI/WPI, L CAS ON LINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Anal. Biochem. 205(2)(1992) Terouanne B. et al. 「Quantitative and qualitative analysis of amplified DNA sequences by a competitive hybridization assay」 P. 193-199	1-10
Y	WO, 9502068, A (WAKUNAGA SEIYAKU KK) 19. 1月 1995 (19. 01. 95) & EP, 664339, A	1-10
Y	Cancer Res. 51(13)(1991) Levi S. et al. 「Multiple K-ras codon 12 mutations in cholangiocarcinomas demonstrated with a sensitive polymerase chain reaction technique」 p. 3497-3502	4-10
Y	WO, 9113075, A (ORION YHTYMAE OY) 5. 9月 1991 (05. 09. 91) & JP, 5-504477, A & EP, 648280, A	4-10

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07. 10. 97

国際調査報告の発送日

14. 10. 97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中 美奈子

4 B

9359

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 6-178700, A(MICROGENICS CORP)28. 6月 1994(28. 06. 94) & EP, 530998, A	1-10
Y	JP, 5-184396, A(ADVANCED SKIN RES. KENKYUSHO KK)27. 7月 1993(27. 07. 93) (Family:none)	1-10
Y	遠藤武男編「DNA診断-分子生物学の臨床応用-」(日本臨牀社)(1989)p. 105-109	1-10

5
IT
Translation

09/214723-1604

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference FAP-1956	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP97/02370	International filing date (day/month/year) 09 July 1997 (09.07.1997)	Priority date (day/month/year) 11 July 1996 (11.07.1996)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q 1/68, C12N 15/11		
Applicant WAKUNAGA PHARMACEUTICAL CO., LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.	
2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.	
<input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).	
These annexes consist of a total of _____ sheets.	
3. This report contains indications relating to the following items:	
I	<input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report
II	<input type="checkbox"/> Priority
III	<input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
IV	<input type="checkbox"/> Lack of unity of invention
V	<input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
VI	<input type="checkbox"/> Certain documents cited
VII	<input type="checkbox"/> Certain defects in the international application
VIII	<input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 19 December 1997 (19.12.1997)	Date of completion of this report 22 September 1998 (22.09.1998)
Name and mailing address of the IPEA/IP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP97/02370

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☒ the international application as originally filed.
- ☐ the description, pages _____, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☐ the claims, Nos. _____, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. _____, filed with the letter of _____,
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☐ the drawings, sheets/fig _____, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP97/02370

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-10	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-10	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-10	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Claims 1-10 do not appear to contain an inventive step based on document 1 [Anal. Biochem. 205 (2) (1992) pages 193-199], document 2 (WO, 95-02068, A), document 3 (JP, 6-178700, A), document 4 [Cancer Res. 51 (13) (1991) pages 3497-3502], document 5 (WO, 911-3075, A), document 6 (JP, 5-184396, A), and document 7 [DNA Diagnosis: Clinical Applications of Molecular Biology (1989) pages 105-109] as cited in the ISR.

The detection of genes by competitive hybridization is described in document 1 and document 2, the modification of probes to detect genes with biotin and DNP is described in document 6 and document 7, and the selection of a concentration to essentially optimize the sensitivity of the method for measuring the relative quantities of reagents used is described in document 3. Therefore, in the detection method described in document 1 and document 2, persons skilled in the art can easily conceive of modifying probes with biotin and DNP as described in document 6 and document 7, and selecting a concentration of reagents for measuring with the probes to optimize the sensitivity as described in document 3.

The determination of a specific sequence for K-ras and its mutant forms is described in document 4 and document 5. Therefore, no particular difficulty is found, even if these genes are specified as the objects to be detected in the above method.

特 許 協 力 条 約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
〔PCT36条及びPCT規則70〕

REC'L	02 OCT 1998
WIPO	PCT

出願人又は代理人 の書類記号 FAP-1956	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP97/02370	国際出願日 (日.月.年) 09.07.97	優先日 (日.月.年) 11.07.96
国際特許分類 (IPC) Int.Cl ⁶ C12Q1/68, C12N15/11		
出願人 (氏名又は名称) 湧永製薬株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。

☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

I ☒ 国際予備審査報告の基礎

II ☐ 優先権

III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成


IV ☐ 発明の単一性の欠如

V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明

VI ☐ ある種の引用文献

VII ☐ 国際出願の不備

VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 19.12.97	国際予備審査報告を作成した日 22.09.98	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 光本 美奈子	4B 9359 
		電話番号 03-3581-1101 内線 3449

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (1994年1月)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とする)

☒ 出願時の国際出願書類

- | | | |
|--------------------------------|----------------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ ページ、 | 出願時のもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ ページ、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ ページ、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ ページ/図、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ ページ/図、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ ページ/図、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 補正により、下記の書類が削除された。

- | | |
|--------------------------------|---------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ ページ |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項 |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ ページ/図 |

3. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))

4. 追加の意見 (必要ならば)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	1-10	有
	請求の範囲		無
進歩性(IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-10	無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-10	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明

請求の範囲1-10は、国際調査報告で提示した文献1(Anal. Biochem. 205(2)(1992)p. 193-199)、文献2(WO, 9502068, A)、文献3(JP, 6-178700, A)、文献4(Cancer Res. 51(13)(1991)p. 3497-3502)、文献5(WO, 9113075, A)、文献6(JP, 5-184396, A)、文献7(「DNA診断—分子生物学の臨床応用—」(1989)p. 105-109)により進歩性を有さない。

文献1及び2には、コンペティティブハイブリダイゼーションにより遺伝子を検出することが、文献6及び7には、遺伝子を検出するためのプローブをビオチンやDNPで修飾することが、文献3には、使用する試薬の相対量を測定法の感度を実質的に最適にしえる濃度とすることがそれぞれ記載されているから、文献1及び文献2に記載される検出方法において、プローブを文献6及び7に記載されるようにビオチンやDNPで修飾し、文献3に記載されるようにプローブと測定する試料の濃度を感度が最適となるようにすることは、当業者が容易に想定しえるものと認められる。

また、文献4及び5には、K-ras及びその変異体等に特異的な配列を決定することが記載されているから、上記方法において検出する対象をこれらの遺伝子とすることにも、格別の困難性は見いだせない。

PATENT COOPERATION TREATY

EO/US
PCT/JP97/02370

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 22 January 1998 (22.01.98)	
International application No.: PCT/JP97/02370	Applicant's or agent's file reference: FAP-1956
International filing date: 09 July 1997 (09.07.97)	Priority date: 11 July 1996 (11.07.96)
Applicant: OKA, Takanori	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:
19 December 1997 (19.12.97)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer:</p> <p>J. Zahra</p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>
--	--

明 細 書

核酸の検査方法、並びに検査キット

技術分野

5 本発明は、遺伝子の変異又は多型を有する核酸を検出、同定又は定量する場合に好適に用いられる核酸の検査方法、並びに検査キットに関し、更に詳述すると、目的核酸の特定領域に遺伝子の変異や多型を微量に含む検体から直接、短時間に、簡易な操作で遺伝子の変異や多型を確実に検出、同定又は定量することができる核酸の検査方法並びに該検査方法を実施するための検査キットに関する。

背景技術

今日、遺伝病として知られているものには、先天的代謝異常症として古くから知られていた数多くの酵素欠損症がほとんど該当することがわかってきており、これらの診断においては、対立遺伝子の片方に変異又は多型が存在する（ヘテロ）か、或いは両方に存在する（ホモ）かを検出することが診断上極めて重要である。

一方、後天的な遺伝子の異常によって引き起こされる疾患、即ち癌は、細胞の特定の遺伝子に突然変異が生じ、その細胞が無秩序に増殖することによって最終的に個体の死に至るものであり、癌などの組織を検体とした場合には、大量の正常細胞と微量に存在する異常細胞（癌細胞）が共存する状況下で、癌細胞中の遺伝子の変異又は多型のみを高感度で検出することが要求される。このため、遺伝子の変異又は多型の種類と病気の進行度、予後の経過などに相関関係がある場合には、単に遺伝子の変異又は多型の有無を検出するだけでなく、変異又は多型を示した遺伝子を同定することが有効かつ必要である。更に、組織切片の正常遺伝子中の変異や多型遺伝子の存在率（含量）を定量することができれば、癌の進行度、予後の治療の様子を追跡することが可能となり、診断・治療に効果的である。

この場合、癌化と関連があると言われている遺伝子（癌関連遺伝

子)には、k-r a s 遺伝子、N-r a s 遺伝子、p 5 3 遺伝子、
B R C A 1 遺伝子、B R C A 2 遺伝子、A P C 遺伝子などがあり、
中でも遺伝子の変異又は多型を生じる位置、種類が比較的集中して
いるもの、或いは変異の位置、種類は不特定であるが出現頻度に偏
りがあるものについて、多くの研究が行われている。

例えば、k-r a s 遺伝子の場合には、その変異の位置が12番
目のコドンに集中しており、特に膵臓癌とk-r a s 遺伝子の変異
の有無とは80%の高い相関関係があることが知られており、k-r
a s 遺伝子の変異の有無を検出することにより膵臓癌の早期診断・
治療が可能となる。

また、p 5 3 遺伝子の場合には、遺伝子の変異又は多型の種類、
位置などは不特定であるが、この場合にも175番目、248番目、
273番目の位置のコドンの変異が全体の約30%を占めており、
遺伝子の変異又は多型の種類、位置と特定の癌との相関関係が明ら
かになれば、その遺伝子の変異又は多型を集中的に検出し、癌の早
期診断・治療に役立つことが期待されている。

一方、癌関連遺伝子以外にも、特定のウィルス・細菌感染の原因
ウィルス、細菌の遺伝子の変異又は多型を検出、同定することがそ
の診断・治療に役立つことが知られている。

例えば、日本国における輸血後肝炎の大部分を占め、慢性化しや
すいC型肝炎の原因ウィルスであるC型肝炎ウィルス(Hepatitis
C Virus; HCV)は、そのputative C gene
領域に遺伝子の多型が存在し、この領域の塩基配列の違いによって
治療薬であるインターフェロンに対する感受性に差が生じることが
知られている。従って、複合感染を起こしているか否か、或いは複
合感染を起こしている場合には、そのウィルス株の遺伝子の変異又
は多型を検出、同定し、更には定量することにより、適切な診断、
治療を施すことが可能となる。

一方、B型肝炎の原因ウィルスであるB型肝炎ウィルス(Hepatitis

B V i r u s ; H B V) は、その p r e - C 領域の塩基配列の遺伝子の多型により分類することが可能であり、その領域の遺伝子の多型によって病態や予後に差が見られることが報告されている。従って、この場合にも複合感染を考えると、微量に存在している可能性のあるウィルス株をその遺伝子の多型を利用して同定又は定量
5 することが、適切な診断、治療を行う上で必要となってくる。

また、細菌感染症においても、多量の薬剤感受性細菌の中に微量の薬剤耐性細菌が混在している場合がある。このような微量の薬剤耐性菌は、通常、薬剤に対する耐性遺伝子の有無により検出されて
10 いるが、ある遺伝子の僅か 1 塩基の置換により薬剤耐性を獲得する場合もあり、このように微量に存在し、しかも僅かな変異による薬剤耐性菌を迅速かつ正確に検出することは、細菌感染症の診断、治療の面で重要なことである。

更に、骨髄移植において、移植受給者（レシーピエント（r e c i p i e n t））
15 の血球が移植供給者（ドナー（d o n o r））の血球と置き換わっているか否かを判定することは、移植の成否、拒絶反応の有無・程度を追跡する上で重要である。この場合、ドナーとレシーピエントの間で特定の遺伝子の多型による相違があれば、この違いを利用して残存するレシーピエント由来の細胞を効率良く検出することが可能
20 となる。例えば、移植時に H L A （H u m a n L e u k o c y t e A n t i g e n）の H L A - D R をマッキングさせた場合、仮にドナーとレシーピエントの H L A - D P が異なっている場合、即ち、遺伝子の多型を有していれば、この H L A - D P の遺伝子の多型を利用して細胞の生着、拒絶反応の有無・程度を追跡することが可能
25 となる。従って、過剰に存在しているドナー由来の血球に含まれる遺伝子の中から、遺伝子の多型を有するレシーピエント由来の遺伝子を迅速かつ高感度に検出、同定する必要がある。更には、遺伝子治療によって新たに導入した遺伝子、或いはその遺伝子からの m R N A の発現を、宿主由来の遺伝子、或いはその発現と区別し検出するこ

とによって遺伝子治療の有効性や経過を追跡することができる。

以上説明した要請を受けて、従来から、遺伝子の変異又は多型を検出、同定すべく種々の方法が検討・提案されている。

その一つとして、オリゴヌクレオチドを用いたドット・ブロット・
5 ハイブリダイゼーション (dot blot hybridization)
法が提案されている (P C R Methods and
A p p l i c a t i o n s , 1 , 2 9 7 (1 9 9 2)) 。この方法
は試料DNA (増幅生成物) 中の遺伝子の変異又は多型を有する塩
基配列と特異的 (相補的) なオリゴヌクレオチドプローブをハイブ
10 リダイゼーションさせ、どのプローブとハイブリダイズしたかによ
って遺伝子の変異又は多型を検出・同定するものである。しかしな
がら、この方法は、ハイブリダイゼーション条件や洗浄条件を正確
にコントロールする必要がある、操作性に劣ると共に、反応に長時
間を要するという欠点がある。

15 また、目的核酸中の変異又は多型を有する塩基配列を特異的に増
幅可能なプライマーを用いてP C R法により遺伝子増幅し、増幅生
成物が生じたか否かによって遺伝子の変異又は多型を検出する方法
が提案されている (N a t u r e , 3 2 4 , 1 6 3 (1 9 8 6)) 。
しかしながら、この方法は、プライマーの種類と同じ数だけP C R
20 法により遺伝子増幅を行わなければならない、操作が複雑な上に、極
めて厳格な反応特異性が要求され、実用的なものではない。

一方、癌関連遺伝子であるk - r a s 遺伝子ように遺伝子の変異
の位置が決まっているものについては、P C R法に用いるプライマー
の3'末端近傍の塩基配列を改変し、正常遺伝子を増幅した時に、
ある種の制限酵素認識配列が生じるように設計された検出方法が提
25 案されている (O n c o g e n e , 6 , 1 0 7 9 (1 9 9 1)) 。
この方法は目的核酸を増幅した後、増幅生成物を制限酵素で切断し、
制限酵素認識配列が切断されたか否かによって、遺伝子の変異又は
多型を有する核酸の検出を行うものであるが、反応条件の設定、制

限酵素処理等の厳格なコントロールが必要となり、煩雑で迅速性に欠けるものである。

また、最近では、ニコラス (J. C. Nicolas) らによって、目的核酸のある領域の不特定の遺伝子の変異又は多型を検出する方法として、遺伝子の変異又は多型を検出しようとする領域を含む核酸断片の二本鎖の一方にビオチン標識を導入し、他方に FITC 標識を導入して標識標準 DNA とし、これに標準 DNA と同じ領域の非標識の核酸断片を含む試料 DNA を過剰量加え、コンペティティブハイブリダイゼーションを行い、最初に加えた標識標準 DNA 量の変化を見ることにより、標識標準 DNA と同じ塩基配列を含む断片が存在するか否かを判定する方法が提案されている (ヨーロッパ公開 3 6 2 0 4 2 号、Anal. Biochem. 205, 193 (1992))。この方法によれば、遺伝子上の変異又は多型の検出や遺伝子型のタイピングを簡易かつ迅速に行うことができるものである。

しかしながら、上記ニコラスらの方法は、対立遺伝子の一方にのみ存在する変異又は多型の検出は可能であるが正常遺伝子中に微量にしか存在しない変異又は多型遺伝子や変異又は多型の種類が不特定の場合には、その検出又は定量は困難である。

更に、本発明者らは、上記ニコラスらの方法とは逆に、標識した試料 DNA に非標識の標準 DNA を過剰に加え、同様にコンペティティブハイブリダイゼーションを行うことにより、核酸の種類に関係なく遺伝子の変異又は多型の有無を検出でき、その存在比も容易に算出できる方法を開発した (以下、PCR-PHFA 法と略す。: PCT/JP94/01106、国際公開 WO 95/02068、Nucl. Acids. Res. 22, 1541 (1994))。この PCR-PHFA 法によれば、ニコラスらの方法では困難であった正常遺伝子中に微量に存在する遺伝子の変異又は多型を有する核酸の検出が可能となるが、遺伝子の変異又は多型の種類を同定し、

更にそれを定量することは困難である。

これら以外にも、核酸中の変異や多型の検出、同定又は定量を行う方法が種々検討されているが、精度、迅速性或いは操作性の点から未だ実用化されていないのが現状である。

5 図面の簡単な説明

図 1 は、本発明の核酸の検査方法を説明する模式図である。

図 2 は、検出対象 DNA の含有量と、理論的に求めたコンペティティブハイブリダイゼーションにより再構成される標識標準 DNA の割合 (INDEX 値) との関係を示すグラフである。

10 図 3 は、実施例 1 で得られた、検出対象 DNA の含有量とコンペティティブハイブリダイゼーションにより再構成された標識標準 DNA の割合 (INDEX 値) との関係を示すグラフである。

発明の開示

本発明は、上記事情に鑑みなされたもので、従来の方法では困難
15 であった正常遺伝子中に微量に存在する遺伝子の変異又は多型を有する核酸を精度良く、迅速かつ簡易な操作で同定、更には定量することができ、癌の早期診断や治療、ウィルス・細菌感染症の診断、及び骨髓移植の成否の判断等に好適に使用し得る、核酸の検査方法、並びに検査キットを提供することを目的とする。

20 本発明者らは、上記目的を達成するために鋭意検討を重ねた結果、検体中の目的核酸の特定領域を増幅して二本鎖の試料 DNA を調製し、一方の鎖に固相担体と結合可能な部位を有し、かつ他方の鎖に検出可能な標識物を有した二本鎖核酸からなる検出対象 DNA と同一な標識標準 DNA に、上記試料 DNA を過剰量加えてコンペティ
25 ティブハイブリダイゼーションを行い、その結果再構成された上記標識標準 DNA を上記検出可能な標識物と固相担体に結合可能な部位とを利用して検出することによって上記試料 DNA と上記標識標準 DNA との間で相補鎖の置換が生じた程度を測定することにより、上記試料 DNA 中に含まれる上記標識標準 DNA と同一な検出対象

D N Aを検出する場合に、上記試料D N A中に含まれる上記標識標準D N Aと同一な検出対象D N Aの検出限界を予め設定し、設定した検出限界に応じて上記コンペティティブハイブリダイゼーションの際に上記標識標準D N Aに加える上記試料D N Aの過剰度を設定
5 することにより、上記試料D N A中に含まれる上記標識標準D N Aと同一な検出対象D N Aが、極微量である場合でも確実にこれを検出することができると共に、上記試料D N Aの過剰度から理論的に求められる検量線に基づいて、上記標識標準D N Aと同一な検出対象D N Aの定量も可能であり、上記標識標準D N Aとして変異を有
10 する核酸或いは多型核酸を標識して用いることにより、正常遺伝子中に微量に存在する遺伝子の変異又は多型を有する核酸を精度良く検出し、同定、更には定量することができることを見出し、本発明を完成したものである。

即ち、本発明は、上記ニコラスらの方法と同様に、標識標準D N A
15 に非標識の試料D N Aを過剰量加えてコンペティティブハイブリダイゼーションを行い、得られたハイブリダイゼーション生成物の標識強度を測定することにより、どの程度標識標準D N Aが希釈されたかを測定する場合に、試料D N A中に含まれる可能性のある上記標識標準D N Aと同一な検出対象D N A、具体的には遺伝子の変異
20 又は多型を有する核酸の種類を予測しておき、目的とする遺伝子の変異又は多型を有する核酸の検出限界を設定し、予測される変異や多型に対応した各標識標準D N Aに対して何倍量の試料D N Aを添加すれば、標識標準D N Aがどの程度希釈されて反応後のハイブリダイゼーション生成物の標識強度がどの程度低下するかを予測して
25 検出限界を設定し、その検出限界に基づいて設定した過剰度の試料D N Aを各標識標準D N Aに加えてコンペティティブハイブリダイゼーションを行い、その結果生じたハイブリダイゼーション生成物の標識強度を測定することにより、検出対象D N Aの存在比率に応じた最適な検出感度の領域で検出を行うものである。その結果、微

量な遺伝子の変異や多型を有する核酸を確実に検出、同定することができ、更に検出感度の高い領域で検出を行うので、検出されるDNAの量が僅かな場合でも、得られる標識強度に有意な差を得ることができ、遺伝子の変異や多型を有する核酸を定量することができるものである。

従って、本発明は、検体中の目的核酸の特定領域を増幅して二本鎖の試料DNAを調製し、一方の鎖に固相担体と結合可能な部位を有し、かつ他方の鎖に検出可能な標識物を有した二本鎖核酸からなる標識標準DNAに、上記試料DNAを過剰量加えてコンペティティブハイブリダイゼーションを行い、その結果再構成された上記標識標準DNAを上記検出可能な標識物と固相担体に結合可能な部位とを利用して検出することによって上記試料DNAと上記標識標準DNAとの間で相補鎖の置換が生じた程度を測定することにより、上記試料DNA中に含まれる上記標識標準DNAと同一な検出対象DNAを検出する核酸の検査方法において、上記試料DNA中に含まれる上記標識標準DNAと同一な検出対象DNAの検出限界を予め設定し、設定した検出限界に応じて上記コンペティティブハイブリダイゼーションの際に上記標識標準DNAに加える上記試料DNAの過剰度を設定することを特徴とする核酸の検査方法を提供する。

また、本発明は、上記本発明検査方法に従って、核酸の検査を行うための検査キットとして、一方の鎖に固相担体と結合可能な部位を有し、かつ他方の鎖に検出可能な標識物を有した二本鎖核酸からなる標識標準DNAを具備してなることを特徴とする核酸の検査キットを提供する。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明につき更に詳しく説明する。

本発明の検査方法は、従来のニコラスらの方法と同様にして、標識標準DNAに非標識の試料DNAを過剰に加えてコンペティティブハイブリダイゼーションし、その結果再構成された上記標識標準

DNAを検出することによって上記試料DNAと上記標識標準DNAとの間で相補鎖の置換が生じた程度を測定することにより、上記試料DNA中に含まれる上記標識標準DNAと同一な検出対象DNAを検出する場合に、上記試料DNA中に含まれる上記標識標準DNAと同一な検出対象DNAの検出限界を予め設定し、設定した検出限界に応じて上記コンペティティブハイブリダイゼーションの際に上記標識標準DNAに加える上記試料DNAの過剰度を設定するものであり、これにより上記標識標準DNAと同一な検出対象DNAが微量であっても確実に検出することができると共に、その定量をも可能としたものである。

その原理について説明すると、まずニコラスらの方法は、一方に検出可能な標識物、他方に固相担体と結合可能な部位を導入した標識標準DNAに非標識の試料DNAを単に過剰に混合し、アニーリングすることによりコンペティティブハイブリダイゼーションを行い、その反応生成物を固相担体にトラップして標識強度を測定することにより、元の状態に再構成された標識標準DNAを測定することができ、標識標準DNAと同じ塩基配列を含む核酸断片が存在するか否かを判定するものである。

しかしながら、例えば試料DNA中に標識標準DNAと同一な検出対象DNAが1%しか含まれてないにもかかわらず、試料DNAの過剰度を単に10倍とした場合、標識標準DNAの希釈率は $10/11$ となり、殆ど希釈されず、1%しか存在しないDNAを検出することができないものである。

そこで、本発明では、試料DNA中に含まれる標識標準DNAと同一な検出対象DNAの検出限界を予め設定しておき、例えば試料DNA中に含まれる5% ($1/20$) 程度の検出対象DNAを検出する場合は、図1に示したように、試料DNA 1を例えば20倍以上の過剰度とするものであり、これにより少なくとも20倍過剰量の試料DNA 1中の $1/20$ については標識標準DNA 2と同一の

塩基配列を有する検出対象DNAということになる。つまり、試料DNA 1 中には標識標準DNA 2 と等量の同一の塩基配列を有する検出対象DNAが含まれることになり、標識標準DNA 2 は $1/2$ に希釈され、測定値は理論上当初の $1/2$ となって、試料DNA 1 中に含まれる標識標準DNA 2 と同一な検出対象DNAを確実に検出することができるものである。なお、このように試料DNA 1 の過剰度を20倍以上とした場合でも試料DNA 1 中に標識標準DNA 2 と同一の塩基配列のDNAが含まれない場合には、理論上標識標準DNAは全く希釈されず、従って上記検出対象DNAが5%含まれている場合の標識強度は全く含まない場合の $1/2$ となる。

同様に、標識標準DNAに対して、40倍過剰量の試料DNAを加える場合を考えると、試料DNA中に2.5% ($1/40$) 量の標識標準DNAと同一の塩基配列を有する検出対象DNAが存在するときに、元の標識標準DNAが再構成される割合は $1/2$ に減少し、標識強度も $1/2$ となる。このことは、標識標準DNAに対して試料DNAの過剰度を増加させるほど、試料DNA中に含まれる微量の標識標準DNAと同一の塩基配列を有する検出対象DNAを検出、同定することが可能となることを意味し、試料DNA中に含まれる標識標準DNAと同一の塩基配列を有する検出対象DNAの量に応じて試料DNAの過剰度を設定することにより、極微量であってもそのDNAを確実に検出、同定することができるものである。

更に、標識標準DNAに対する試料DNAの過剰度と、試料DNA中に含まれる標識標準DNAと同一の塩基配列を有する検出対象DNAの含有量とが、標識標準DNAが再構成される割合に与える影響について、理論的に考察すると、下記表1の通りであり、これをグラフにしたものが図2である。

表-1

含有量* ² (%)	標識 : 試料* ¹				
	1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 160	
0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	I N D E X 値* ³
1.0	83.3	71.4	55.6	38.5	
2.5	66.7	50.0	33.3	20.0	
5.0	50.0	33.3	20.0	11.1	
10.0	33.3	20.0	11.1	5.9	
20.0	20.0	11.1	5.9	3.0	
30.0	14.3	7.7	4.0	2.0	
50.0	9.1	4.8	2.4	1.2	
100.0	4.8	2.4	1.2	0.6	

* 1 : 標識標準DNAと試料DNAとの比率

* 2 : 試料DNA中に含まれる標識標準DNAと同一の塩基配列を有する検出対象DNAの割合

* 3 : 元の標識標準DNAに対する再構成される標識標準DNAの割合 (%)

表1及び図2に示されているように、標識標準DNAと試料DNAとの比率が1 : 20の場合、標識標準DNAと同一の塩基配列を有する検出対象DNAが5%の時にINDEX値が50となるのに対して、標識標準DNAと試料DNAとの比率が1 : 160の場合には標識標準DNAと同一の塩基配列を有する検出対象DNAが1%の時にINDEX値が50以下を示すことが理論的に導き出される。このことは、標識標準DNAに対する試料DNAの過剰度を増せば増すほど、試料DNA中の標識標準DNAと同一の塩基配列を有する検出対象DNAが微量であっても検出、同定できることを示して

おり、また逆に適切な過剰度によりコンペティティブハイブリダイゼーションを行えば、その過剰度と得られたINDEX値から試料DNA中に含まれる標識標準DNAと同一の塩基配列を有する検出対象DNAの量を微量であっても理論的に求められることを示している。

このように、本発明の検査方法は、試料DNA中に含まれる標識標準DNAと同一な検出対象DNAの検出限界を予め設定し、設定した検出限界に応じて上記コンペティティブハイブリダイゼーションの際に上記標識標準DNAに加える上記試料DNAの過剰度を設定し、適切な過剰度の試料DNAを標識標準DNAに加えてコンペティティブハイブリダイゼーションを行うことにより、試料DNA中に含まれる標識標準DNAと同一な検出対象DNAを微量であっても確実に検出、同定し、更にその定量まで行うことができるものである。

本発明の検査方法は、まず検体中の目的核酸の特定領域を増幅して二本鎖の試料DNAを調製する。この場合、目的核酸としては、癌関連遺伝子、遺伝病に関連する遺伝子、ウィルス遺伝子、細菌遺伝子及び多型を有する宿主遺伝子由来のもの等が挙げられる。

ここで、多型を有する宿主由来の遺伝子とは、病気等の原因とは直接関係ない宿主由来の遺伝子の多型をいい、例えば、HLAや血液型に関する遺伝子等がある。これらの遺伝子は通常宿主の染色体上に存在するが、ミトコンドリア遺伝子にコードされている場合もある。このような目的核酸を含む検体としては、例えば、細菌、ウィルス等の病原体、生体から分離された血液、唾液、組織病片等、或いは糞尿等の排泄物が挙げられる。更に、出生前診断を行う場合は、羊水中に存在する胎児の細胞や、試験管内での分裂卵細胞の一部を検体とすることもできる。また、これらの検体は直接、又は必要に応じて遠心分離操作等により沈渣として濃縮した後、例えば、酵素処理、熱処理、界面活性剤処理、超音波処理、或いはこれらの

組み合わせ等による細胞破壊処理を予め施したものを使用することができる。この場合、上記細胞破壊処理は、目的とする組織由来のDNAを顕在化させる目的で行われるものである。なお、細胞破壊処理の具体的な方法は、PCRプロトコルス アカデミック プレス インク p 14、p 352 (1990) (PCR PROTOCOLS Academic Press Inc., p 14、p 352 (1990)) 等の文献に記載された公知の方法に従って行うことができる。また、検体中のDNAはトータル量で1~100 μ g程度であることが好ましいが、1 μ g以下でも充分増幅可能である。

上記検体中の目的核酸を遺伝子増幅して試料DNAを調製する方法としては、特に制限されず、遺伝子増幅用プライマーを用いた方法を採用することができ、また化学合成或いは部分的に化学合成したものを酵素的に連結することによって調製することも可能である。更に、試料DNAについては、このようにして増幅したDNAをプラスミドベクター、ファージベクター、又はプラスミドとファージのキメラベクターから選ばれるベクターに組み込み、大腸菌、枯草菌等の細菌或いは酵母等の増殖可能な任意の宿主に導入して大量に調製することもできる。

この場合、プライマーを用いて遺伝子増幅する方法としては、公知のPCR (Polymerase Chain Reaction) 法、LCR (Ligase chain Reaction) 法、3SR (Self-sustained Sequence Replication) 法、SDA (Strand Displacement Amplification) 法等が用いられ (Manak, DNA Probes 2nd Edition p255~291, Stockton Press (1993))、特にPCR法が好適である。

ここで、PCR法につき更に説明すると、上記目的核酸を増幅するためのプライマーは、目的核酸が存在すれば、プライマーの伸長反応に基づく遺伝子増幅反応が起こる。この場合、プライマーの伸

長反応は、4種又は5種のヌクレオチド三リン酸（デオキシアデノシン三リン酸、デオキシグアノシン三リン酸、デオキシシチジン三リン酸、及びチミジン三リン酸或いはデオキシウリジン三リン酸（これらの混合物をdNTPということもある））を基質として該プライマーに取り込ませることにより行われる。

この伸長反応を行う場合、通常核酸鎖を増幅するために上記単位核酸及び核酸伸長酵素を含む増幅反応試薬が用いられ、この場合、核酸伸長酵素としてはE. coli DNAポリメラーゼI、E. coli DNAポリメラーゼIのクレノウ断片、T4 DNAポリメラーゼ等の任意のDNAポリメラーゼを用いることができるが、特にTaq DNAポリメラーゼ、Tth DNAポリメラーゼ、Vent DNAポリメラーゼ等の熱安定性DNAポリメラーゼを用いることが好ましく、これによりサイクル毎に新たな酵素の添加の必要性がなくなり、自動的にサイクルを繰り返すことが可能になり、更にアニーリング温度を50～60℃に設定することが可能なためプライマーによる標的塩基配列認識の特異性を高めることができ、迅速かつ特異的に遺伝子増幅反応を行うことができる（詳細については特開平1-314965号、同1-252300号公報参照）。

また、この反応を行う際、反応溶液の水分の蒸発を防止するためにオイルを添加することができる。この場合、オイルは水と分配可能で、かつ水より比重の軽いものであればよく、具体的にはシリコンオイル、ミネラルオイル等が例示される。また、遺伝子増幅装置によってはこのような媒体を必要としないものもあり、このような遺伝子増幅装置を用いてプライマーの伸長反応を行うこともできる。

このように、上記核酸増幅用プライマーを用いて伸長反応を繰り返すことにより、検体中の目的核酸を効率的に遺伝子増幅させることができ試料DNAを大量に調製することができる。なお、この遺伝子増幅反応を行う条件等の具体的な方法については、実験医学、羊土社、8、No. 9（1990）、PCRテクノロジースト

ックトン プレス (PCR Technology Stockton press (1989)) 等の文献に記載された公知の方法に従い行うことができる。

次に、標識標準DNAに上記遺伝子増幅の結果得られた試料DNA
5 を過剰量加え、コンペティティブハイブリダイゼーションを行う。

この場合、上記標識標準DNAは、上記試料DNA中の検出対象DNAと同一な二本鎖核酸であり、かつ一方の鎖に固相担体と結合可能な部位を有し、他方の鎖に検出可能な標識物を有するものである。

10 上記検出可能な標識物としては、非放射性物質、放射性物質のどちらを用いてもよいが、好ましくは非放射性物質が用いられる。非放射性物質のうち、直接検出可能なものとしては蛍光物質〔例えばフルオレッセイン誘導体（フルオレッセインイソチオシアネート等）、
15 ローダミン及びその誘導体（テトラメチルローダミンイソチオシアネート等）〕、化学発光物質（例えばアクリジン等）などが挙げられる（特開平1-252300号公報参照）。また、標識物と特異的に結合する物質を利用すれば間接的に標識物を検出することができる。こうした場合の標識物としては、ビオチン、リガンド、特定の核酸或いは蛋白質、ハプテン等が挙げられ、ビオチンの場合には
20 これに特異的に結合するアビジン或いはストレプトアビジンが、ハプテンの場合はこれに特異的に結合する抗体が、リガンドの場合はレセプターが、特定の核酸或いは蛋白質の場合はこれと特異的に結合する核酸、核酸結合蛋白質或いは特定の蛋白質と親和性のある蛋白質等が利用できる。上記ハプテンとしては、2, 4-ジニトロフ
25 ェニル基を有する化合物やジゴキシゲニンを使うことができ、更にはビオチン或いは蛍光物質等もハプテンとして使用することができる。なお、検出可能な標識物と固相担体に結合可能な部位とは同一であってよい。

標識標準DNAは、例えば検出対象DNAが変異を有する核酸や

多型を有する核酸である場合には、目的核酸の特定領域の遺伝子の変異又は多型を有する核酸を調製し、これを固相担体と結合可能な部位を導入したプライマーと、検出可能な標識物を導入したプライマーを用いて遺伝子増幅することにより、調製することができる。

- 5 この場合、目的核酸に変異又は多型を有しなくてもプライマーの塩基配列に変異又は多型を有していれば、このプライマーを用いて遺伝子増幅することにより、容易に変異又は多型を有する標識標準DNAを調製することもできる。

10 なお、標識標準DNAについても遺伝子増幅を利用しないで天然の遺伝子から制限酵素により酵素的に直接切り出してもよく、更には、正常核酸を増幅したものをプラスミドベクター、ファージベクター、及びプラスミドとファージのキメラベクターから選ばれるベクターに組み込み、大腸菌、枯草菌等の細菌或いは酵母等の増殖可能な任意の宿主に導入して大量に調製することもできる（遺伝子クローニング）。また、場合によっては化学合成によって調製することも可能である。化学合成としては、トリエステル法、亜リン酸法等が挙げられ、これらは液相法又は不溶性の担体を使った固相合成法などにより通常の自動合成機（APPLIED BIOSYSTEMS 社392等）により一本鎖のDNAを大量に調製し、その後アニー

15 リングを行うことにより二本鎖DNAを調製することができる。この場合、得られた二本鎖DNAの5'末端にアミノ基を導入し（特開昭59-93100号公報参照）、このアミノ基に任意の標識物を導入する（特開昭59-204200号、同59-148798号公報参照）ことにより、標識標準DNAを合成することができる。

25 そして、上記標識標準DNAに上記試料DNAを過剰に加えてコンペティティブハイブリダイゼーションを行うが、この場合本発明の検査方法では、予め試料DNA中に含まれる検出対象DNAの検出限界を設定しておき、それに基づいて試料DNAの過剰度を設定する。上記試料DNA中に含まれる検出対象DNAの検出限界の設

定は、目的核酸及び検出対象DNAの種類によって設定することができ、例えばk-ras遺伝子、N-ras遺伝子、p53遺伝子、BRCA1、遺伝子、BRCA2遺伝子、又はAPC遺伝子等の癌関連遺伝子の後天的変異や多型の場合は通常10%以下、ウィルス
5 遺伝子や細菌類の変異や多型の場合は通常10%以下、染色体DNA中の変異や多型の場合は50%、ミトコンドリア遺伝子の場合は1%以下に適宜設定することができる。

更に、検出限界の設定に基づいて設定される試料DNAの過剰度は、コンペティティブハイブリダイゼーションを行った際に、ハイ
10 ブリダイゼーション生成物の標識強度から検出対象DNAの検出、同定が可能な過剰度であればよく、標識強度の測定法などに応じて適宜検出限界を設定し、上述した理論INDEX値から適宜求めればよく、特に制限されるものではない。例えば、検出、同定を行う
場合には、検出対象DNAが存在しない場合の標識強度に比べて著
15 しく標識強度が変化し、検出対象DNAの有無の判定が容易になる程度の過剰度とすればよく、また定量を行う場合には、予測される検出対象DNAの存在割合に応じて、その割合付近の強度変化量が比較的大きくなり、有効な検量線が得られるように過剰度を設定すればよい。

20 過剰度の具体的な設定方法としては、特に制限されるものではないが、試料DNA中に含まれる標識標準DNAと同一な検出対象DNAの検出限界をA/Bに設定した場合に、試料DNAの過剰度をB/A倍以上とすることができ、好ましくは1.5B/A倍以上、より好ましくは2A/B倍～1000A/B倍とすることができる。試
25 料DNAは、予め電気泳動、紫外線照射、又は吸光度により含まれるDNA（総量）を定量しておけば、過剰度に応じて試料DNAを適量加えることもできる。

上記過剰量の試料DNAを標識標準DNAに加えてコンペティティブハイブリダイゼーションを行う際には、上記両DNAを変性す

る必要があるが、変性方法は熱による方法或いはアルカリによる方法が好ましい。また両DNAを混合する時期は変性直後でもよいし、変性後であってもよい。

更に、コンペティティブハイブリダイゼーションにおいては、溶液中の塩濃度が最適になるように調製する必要がある、それは鎖長
5 によるところが大きい。一般に、ハイブリダイゼーションにおいては、SSC (20×SSC: 3M塩化ナトリウム、0.3Mクエン酸ナトリウム) やSSPE (20×SSPE: 3.6M塩化ナトリウム、0.2Mリン酸ナトリウム、2mM EDTA) が使われて
10 おり、本発明の検査方法でもこれらの溶液を好適な濃度に希釈して使用することができる。また、必要に応じてジメチルスルフォキシド (DMSO)、ジメチルフォルムアミド (DMF) などの有機溶媒を添加することもできる。

コンペティティブハイブリダイゼーションは上記の方法で変性した両DNAを混合し、高温から徐々に温度を下げることにより達成
15 することができる。この場合、温度条件については、ハイブリダイゼーションを行うDNA鎖長や塩基配列及び変性塩基配列と正常塩基配列との違いに応じて適宜最適条件が設定されるが、通常は98
〜50℃までの範囲で3〜10分間に1℃の速度、より好ましくは
20 98〜70℃までの範囲で10分間に1℃の速度で温度を下げる条件とすることができる。

次に、コンペティティブハイブリダイゼーション生成物につき、ED-PCR法 (特開平1-314965号公報、同1-252300号公報、J. Clin. Microbiol. 30, 1728 (1992)
25 等参照) の原理に基づいて測定を行う。即ち、ED-PCR法においては、二本鎖核酸のそれぞれの鎖に異なる標識物 (場合によっては同じ標識物でもよい) が存在する場合のみ、その二本鎖核酸の存在をシグナルとして示すことができる。従って、上記コンペティティブハイブリダイゼーション生成物においては、試料DNAと標識

標準 DNA の間で鎖間の組み換え頻度が高いほどシグナルは低くなる。つまり、目的核酸の特定領域に標識標準 DNA と同じ塩基配列を有する核酸が多いほどシグナルは低くなる。

このように、上記ハイブリダイゼーション生成物の測定を行い、
5 該測定結果から遺伝子の変異又は多型を有する核酸の有無並びにその存在比を求めるが、この場合、測定は使用する標識物に応じて一般的手法を用いることができる。例えば、標識物がラジオアイソトープであれば、そのままシンチレーションカウンターを用いて放射能強度を測定すればよく、また標識物が蛍光性物質であれば、そのま
10 ま蛍光光度計を用いて蛍光強度を測定すればよい（特開平 1-252300 号公報参照）。

一方、標識標準 DNA に直接検出可能な標識物以外の標識物を導入した場合には、その標識物を間接的に測定するための試薬が用いられる。この場合、測定試薬としては、例えば標識物がビオチンで
15 ある場合にはアビジン又はストレプトアビジンと酵素との結合体等が、標識物がハプテンである場合にはハプテンと特異的に結合する抗体に酵素を結合させた抗体-酵素結合体、該酵素の基質等が用いられ、これら試薬を用いることにより該試薬と標識物とが反応して、
20 色的又は蛍光的手段により検出可能な成分を得ることができる。なお、これら試薬に用いられる酵素、基質としては、酵素が β -D-ガラクトシダーゼの場合、基質として 2-ニトロフェノール- β -D-ガラクトシド、4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトシド、酵素がペルオキシダーゼの場合、基質として 3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオニックアシド、3, 3', 5, 5'-
25 テトラメチルベンジジン、1, 2-フェニレンジアミン等、酵素がアルカリホスファターゼの場合、基質として 4-メチルウンベリフェリルフォスフェート、NADP、4-ニトロフェニルフォスフェート等、酵素がグルコース-6-リン酸脱水素酵素の場合、基質としてグルコース、NAD 等、また酵素がアルコール脱水素酵素である

場合、基質としてエタノール、NAD等を用いることができる。

なお、上記ハイブリダイゼーション生成物の測定は、該ハイブリダイゼーション生成物を固相担体にトラップして行われるが、この場合固相担体としては上記プライマーに導入された固相担体結合部位と特異的に結合可能な固相担体を用いられ、具体的には、マイクロタイターウェルを該部位が特異的に結合するように処理したものを
5 用いることが好適である。

上記測定の結果、試料DNA中に標識標準DNAと同一の塩基配列が存在しない場合は、標識標準DNAと試料DNAとの間で相補鎖の置換が起こる割合は低く、標識強度はあまり低下しない。しかし、目的核酸の特定領域に標識標準DNAと同一の塩基配列が存在する場合には、その含量に応じて標識標準DNAと試料DNAとの間で相補鎖の置換が起こる割合が高く、標識強度の低下が生じる。
10 この場合、本発明の検査方法では、試料DNA中に含まれている変異又は多型を有する核酸などの検出対象DNAにつき、上述のように目的に応じて検出限界を予め設定しておき、この検出限界に応じて添加する試料DNAの量（過剰度）を決定し、コンペティティブハイブリダイゼーションを行う。従って、目的核酸の特定領域に標識標準DNAと同一の塩基配列が存在する場合には、それが微量であつても、上記標識強度は著しく低下し、確実に検出、同定を行う
15 ことができると共に、その割合に応じて有意に標識強度が変化し、容易に定量を行うことができるものである。

次に、本発明の検査キットは、上記本発明の検査方法に従って遺伝子の変異又は多型を有する核酸の検出、同定及び定量を行うための検査キットであつて、一方の鎖に固相担体と結合可能な部位を有し、かつ他方の鎖に検出可能な標識物を有した二本鎖核酸からなる
25 標識標準DNAを具備してなるものである。この場合、上記標識標準DNAの検出可能な標識物及び固相担体と結合可能な部位は、上記検査方法で説明したこれらと同様のものを用いることができ、ま

たこの標識標準DNAは上記検査方法で説明した方法と同様にして作製することができる。

本発明の検査キットは、上記本発明の検査方法に従って、必要により細胞破壊処理等の前処理を施した検体から試料DNAを調製し、この試料DNAを上記標識標準DNAに過剰に加えてコンペティティブハイブリダイゼーションを行った後、得られたハイブリダイゼーション生成物を固相担体にトラップして、両DNAの組み換えの度合を測定するものであり、この場合、検体中の目的核酸の特定領域を増幅するための増幅用プライマー、試料DNA増幅反応試薬及びハイブリダイゼーション生成物をトラップするための担体としては公知のものを使用することができ、これらと組み合わせて本発明の目的核酸の特定領域の変異又は多型を有する核酸の検出、同定及び定量用検査キットとすることができる。

更に、上記本発明の核酸の検査方法で説明した検体前処理用の細胞破壊試薬、増幅反応生成物を洗浄するための洗浄液、反応溶液の水分の蒸発を防止するためのオイル及び標識物を間接的に測定するための試薬などを用いることができ、これらと組み合わせて本発明の検査キットとすることもできる。

以下、実施例と比較例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明は下記実施例に制限されるものではない。

[実施例 1]

1 塩基置換の遺伝子の変異又は多型の検出モデルを以下に示す。

プライマー

下記に示す、ヒト染色体 k-ras 遺伝子と完全に相補的な塩基配列を持つ一対のプライマー (k-ras-5n、k-ras-3) と、1塩基のミスマッチを有する一対のプライマー (k-ras-5m、k-ras-3) を用いた。

k-ras-5n

配列番号：1

5' - T A T A A A C T T G T G G T A G T T G G A G C T - 3'
k - r a s - 5 m (変異塩基を下線で示す)

配列番号 : 2

5' - T A T A A A C T T G T G G T A G T T G G A C C T - 3'
5 k - r a s - 3

配列番号 : 3

5' - T A T C G T C A A G G C A C T C T T G C C - 3'

標識標準DNAの調製

まず、ヒト染色体 k - r a s 遺伝子と1塩基だけ異なる配列を有
10 する標識標準DNAを調製するために、ヒト正常染色体 k - r a s
遺伝子 100 ng をテンプレートとし、ビオチンを導入した B i o
- k - r a s - 5 m (100 ng) と D N P を導入した D N P - k
- r a s - 3 (100 ng) を一対のプライマーとして用い、200
μ M の d N T P 存在下、100 μ l の 10 m M トリス-塩酸緩衝液
15 (p H 8. 3)、50 m M K C l、1. 5 m M M g C l₂、0.
001%ゼラチン及び2 unitのAmp l i t a qTM DNAポリ
メラーゼを含む反応液中でPCR法により遺伝子増幅反応を行った。
PCR法は、サーマルサイクラー (T h e r m a l C y c l e r)
P J 2000 (パーキンエルマー (P e r k i n E l m e r) 社
20 製) を用い、94℃、30秒、56℃、30秒のサイクルを35回
繰り返した。得られた反応液をアガロースゲル電気泳動により分析
し、そのサイズと増幅効率を測定した。

非標識DNAの調製

一方、ヒト染色体 k - r a s 遺伝子と同一の塩基配列を有する非
25 標識DNAは、上記反応液組成と同一のものに、N H₂ - k - r a s
- 5 n と N H₂ - k - r a s - 3 を一対のプライマーとして用い、上
記同様のPCR法により遺伝子増幅した。得られた反応液をアガロ
ースゲル電気泳動により分析し、そのサイズと増幅効率を測定した。

ヒト染色体 k - r a s 遺伝子と1塩基だけ異なる配列を有する非

標識 DNA は、上記反応液組成と同一のものに、NH₂-k-r a s-5 m と NH₂-k-r a s-3 を一対のプライマーとして用い、上記同様の PCR 法により遺伝子増幅した。得られた反応液を上記同様に測定した。

5 試料 DNA の調製

得られた正常遺伝子と同一の塩基配列を有する非標識 DNA と正常遺伝子と 1 塩基だけ異なる塩基配列を有する非標識 DNA を種々の割合で混合し、正常遺伝子中に変異遺伝子が 0.0%, 1.0%, 2.5%, 10.0%, 20.0%, 30.0%, 50.0%, 100.0% 存在する非標識試料 DNA を調製した。

10 コンペティティブハイブリダイゼーション

次に、上記標識標準 DNA と上記非標識試料 DNA の系列を種々の割合で混合し、コンペティティブハイブリダイゼーションを行った。

15 標識標準 DNA と非標識試料 DNA の混合比が 1 : 20 の系 (PCR 反応液にして標識標準 DNA 1 μ l、非標識試料 DNA 20 μ l の割合で混合)、1 : 40 の系 (標識標準 DNA 0.5 μ l、非標識試料 DNA 20 μ l の割合で混合) を調製した。なお、混合した溶液の塩濃度は 3.3 \times SSC (20 \times SSC : 0.3 M クエン酸ナトリウム、pH 7.0、3 M 塩化ナトリウム) で調製し、反応液の量を 30 μ l とした。この溶液を Programmable Thermal

20 Controller PTC-100 (MJ Research 社製) を用いて 98 $^{\circ}$ C、10 分間加熱し DNA を熱変性した後、1 $^{\circ}$ C / 10 分の速度で 68 $^{\circ}$ C まで徐冷し、二本鎖形成反応 (コンペティティブハイブリダイゼーション) を行った。

25 得られた各反応液を 20 μ l 分取し、ED-PCR 法により再構成された標識標準 DNA 量を測定し、元の標識標準 DNA が何%再構成されたかを定量し、元の標識標準 DNA に対する再構成された標識標準 DNA の割合 (INDEX 値) を求めた。結果を変異遺伝

子含量と I N D E X 値との関係を示すグラフとして図 3 に示す。

図 3 の結果から、標識標準 D N A と非標識試料 D N A を 1 : 2 0 の割合で混合した場合には、変異遺伝子含量が 5 . 0 % 程度で I N D E X 値は 5 0 程度となり十分検出可能となった。また、1 : 4 0 の割合で混合した場合には、遺伝子含量が 2 . 5 % のときに I N D E X 値が 5 0 程度で十分検出可能となり、変異遺伝子の検出が可能となる
5 ことがわかった。即ち、標識標準 D N A に対して非標識試料 D N A の添加量（過剰度）を増やすと、実際に検出感度が向上することが確認された。

また、I N D E X 値と変異遺伝子含量とには明らかに相関関係があり、I N D E X 値と標識標準 D N A に対する非標識試料 D N A の添加量（過剰度）が解れば、検体中の変異遺伝子の存在率（変異遺伝子含量）を定量し得ることが確認された。

[実施例 2]

ヒト染色体 k - r a s 遺伝子の 1 2 番目のコドンに関して、1 塩基置換によって生じるアミノ酸置換をもたらす総ての遺伝子変異に相当する標識標準 D N A を調製し、上記実施例 1 と同様の方法に従って、遺伝子変異を検出、同定する方法について、以下に説明する。

正常な k - r a s 遺伝子の 1 2 番目のコドンは G G T (G l y) であり、このコドンと 1 塩基置換によりアミノ酸置換をもたらすものとしては、G C T (A l a) 、 G T T (V a l) 、 G A T (A s p) 、 C G T (A r g) 、 A G T (S e r) 、及び T G T (C y s) の 6 種類が挙げられる。

プラスミドの調製

正常ヒト染色体 D N A 0 . 1 μ g を 1 0 0 n g の下記プライマー (K 1 2 - P 1 、 K 1 2 - P 2) を用いて実施例 1 の条件で P C R 法により遺伝子増幅した。得られたフラグメントをプラスミド p B l u e s c r i p t (S T R A T A G E N E より入手可能) に導入し、その塩基配列を確認した。これをプラスミド p K R 1 と命
25

名した。

K 1 2 - P 1

配列番号 : 4

5' - G G C C T G C T G A A A A T G A C T G A - 3'

5 K 1 2 - P 2

配列番号 : 5

5' - T T G T T G G A T C A T A T T C G T C C - 3'

6 種類の変異 DNA は上記プラスミド p K R 1 を基にオリゴヌクレオチドダイレクトミュータジェネシス (oligonucleotide directed mutagenesis) 法により調製した (井川 俊太郎; 実験医学別冊「遺伝子工学ハンドブック」、p 2 4 6 参照)。得られたプラスミド (標準 DNA) の塩基配列を測定し、目的とする塩基配列の 6 種類の標準 DNA が調製できていることを確認した。

15 プライマー

遺伝子増幅に用いるプライマーの塩基配列は以下に示す通りである。

k - r a s - 4 3 - 5

配列番号 : 6

20 5' - A A C T T G T G G T A G T T G G A G C T - 3'

k - r a s - 4 3 - 3

配列番号 : 7

5' - A A G G C A C T C T T G C C T A C G C C - 3'

標識標準 DNA の調製

25 上記 7 種類の各遺伝子を組み込んだプラスミド (標準 DNA) 1 ng をテンプレートとして、上記プライマーを標識した Bio - k - r a s - 4 3 - 5 (100 ng) と DNP - k - r a s - 4 3 - 3 (100 ng) を一対のプライマーとして用い、上記実施例 1 と同様の PCR 法により遺伝子増幅し、計 7 種類の標識標準 DNA を調製した。

非標識DNAの調製

一方、非標識DNAは上記同様の7種類の各遺伝子を組み込んだプラスミド(標準DNA) 1 ngをテンプレートとして、NH₂-k-ras-43-5 (100 ng)とNH₂-k-ras-43-3 (100 ng)を一对のプライマーとして用い、上記実施例1と同様のPCR法により遺伝子増幅し、計7種類の非標識DNAを調製した。

試料DNAの調製

得られた6種類の変異遺伝子を有する非標識DNAを正常遺伝子と同一の塩基配列を有する非標識DNAと混合し、正常遺伝子98%と2% GCT変異遺伝子、正常遺伝子99%と1% GCT変異遺伝子、正常遺伝子99%と1% GTT変異遺伝子、正常遺伝子99%と1% GAT変異遺伝子、正常遺伝子99%と1% CGT変異遺伝子、正常遺伝子99%と1% AGT変異遺伝子、正常遺伝子99%と1% TGT変異遺伝子、及び正常遺伝子98%と1% GCT + 1% CGT変異遺伝子からなる非標識試料DNAをそれぞれ調製した。

コンペティティブハイブリダイゼーション

PCR反応液として、上記標識標準DNA 0.125 μlに上記各非標識試料DNA 20 μl (160倍過剰量)を混合し、その他の反応液組成及び条件は上記実施例1と同様にしてコンペティティブハイブリダイゼーションを行った。この場合、対照として非標識試料DNAの代わりに水を用いて同様にコンペティティブハイブリダイゼーションを行った。

得られた反応液を20 μl分取し、ED-PCR法により再構成された標識標準DNA量を発色強度として測定した。結果を表2, 3に示す。この場合、表2では、水を用いた場合に示した発色強度を100としたときの100分率(INDEX値)で示し、表3では100%正常遺伝子(GGT)を含む検体(normal)の示

した発色強度を100とした場合の100分率（INDEX値）で示した。

表-2

標識標準 DNA		非 標 識 試 料 D N A									
		H ₂ O	normal	2% GCT	1% GCT	1% GTT	1% GAT	1% CGT	1% AGT	1% TGT	1% GCT + 1% CGT
1	GGT	100.0	0.7	1.4	2.2	1.5	1.4	0.9	2.1	1.6	1.8
2	GCT	100.0	71.7	23.2	32.0	71.7	91.9	71.8	70.8	73.1	29.8
3	GTT	100.0	48.9	42.9	47.1	21.7	46.7	50.1	48.2	47.0	43.5
4	GAT	100.0	60.5	52.6	60.3	58.5	21.8	56.6	60.0	56.5	56.7
5	CGT	100.0	77.8	74.2	74.2	73.2	71.7	24.7	72.3	71.9	24.6
6	AGT	100.0	56.4	55.7	56.8	53.8	56.4	49.6	20.1	52.6	52.0
7	TGT	100.0	57.4	55.3	54.6	59.0	58.5	53.7	53.8	21.9	53.4

表-3

標識標準 DNA		非 標 識 試 料 D N A									
		H ₂ O	normal	2% GCT	1% GCT	1% GTT	1% GAT	1% CGT	1% AGT	1% TGT	1% GCT + 1% CGT
1	GGT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	GCT	-	100	32	45	100	128	100	99	102	42
3	GTT	-	100	88	96	44	96	102	99	96	89
4	GAT	-	100	87	100	97	36	93	99	93	94
5	CGT	-	100	95	95	94	92	32	93	92	32
6	AGT	-	100	99	101	95	100	88	36	93	92
7	TGT	-	100	96	95	103	102	93	94	38	93

表2の結果から、2%、1% G C Tの検体は正常遺伝子由来の標識標準DNA（G G T）とG C T変異遺伝子由来の標識標準DNAに対してI N D E X値が有意に小さくなり、G C T変異遺伝子を含むことがわかった。同様に1% G C T + 1% C G Tの検体は正常遺伝子由来、G C T変異遺伝子由来、C G T変異遺伝子由来の標識標準DNAに対してI N D E X値が有意に小さくなり、G C T変異遺伝子、C G T変異遺伝子を含むことがわかった。また、他の検体においても正常遺伝子と含有する変異遺伝子由来の標識標準DNAに対してI N D E X値が有意に小さくなり、非標識試料DNA検体はI N D E X値が小さな値を示した標識標準DNAと同一の塩基配列を含むことが確認できた。

従って、上記方法によれば検体中の遺伝子の変異又は多型を有するコドンの検出だけでなく、変異又は多型を示した塩基配列の同定も可能となることが判った。

また、表3に示されているように、各検体のI N D E X値は45

～ 3 2 を示しており、上記表 1 に示した理論 I N D E X 値及び図 2 に示した検量線から、変異の含有割合は 1 ～ 2 % であることが示され、実際の含有割合とほぼ一致することが確認された。従って、上記方法によれば遺伝子の変異又は多型の定量を行うことも可能であることが確認された。

[実施例 3]

実際に、ヒトの癌組織から染色体 k - r a s 遺伝子を抽出し、検体 # 1 ～ 検体 # 4 を調製した。なお n o r m a l は 1 0 0 % 正常遺伝子検体である。これらをテンプレートとして実施例 2 と同様の方法で P C R 法により遺伝子増幅し、非標識試料 D N A を調製した。この非標識試料 D N A 2 0 μ l を実施例 2 と同様の 7 種類の標識標準 D N A 0 . 1 2 5 μ l に加えて (1 6 0 倍過剰量) 混合し、コンペティティブハイブリダイゼーションを行い、上記実施例 2 と同様に I N D E X 値を求めた。結果を表 4 , 5 に示す。この場合、表 4 では、水を用いた場合に示した発色強度を 1 0 0 としたときの 1 0 0 分率 (I N D E X 値) で示し、表 5 では 1 0 0 % 正常遺伝子 (G G T) を含む検体 (n o r m a l) の示した発色強度を 1 0 0 とした場合の 1 0 0 分率 (I N D E X 値) で示した。

表-4

標識 DNA		H ₂ O	normal	検体 # 1	検体 # 2	検体 # 3	検体 # 4
1	GGT	100.0	0.7	0.8	0.9	0.7	0.6
2	GCT	100.0	71.7	74.0	69.2	66.1	70.9
3	GTT	100.0	48.9	45.3	49.2	10.0	43.8
4	GAT	100.0	60.5	56.5	5.4	55.7	57.3
5	CGT	100.0	77.8	74.3	75.3	74.6	2.3
6	AGT	100.0	56.4	57.3	51.8	48.6	56.7
7	TGT	100.0	57.4	55.3	53.9	58.3	53.8

表-5

標識 DNA		H ₂ O	normal	検体 # 1	検体 # 2	検体 # 3	検体 # 4
1	GGT	-	-	-	-	-	-
2	GCT	-	100.0	103.2	96.5	92.2	98.9
3	GTT	-	100.0	92.6	100.6	20.4	89.6
4	GAT	-	100.0	93.4	8.9	92.1	94.7
5	CGT	-	100.0	95.5	96.8	95.9	3.0
6	AGT	-	100.0	101.6	91.8	86.2	100.5
7	TGT	-	100.0	96.3	93.9	101.6	93.7

表4の結果から、検体#1は、正常遺伝子由来のGGT標識標準DNAに対してのみINDEX値が低い値を示し、normalと同じ挙動を示したことから、変異遺伝子を有しないことが判った。

検体 # 2 は、正常遺伝子由来の G G T と G A T の変異遺伝子由来の
標識 D N A に対して I N D E X 値が有意に低い値を示し、G A T の
変異遺伝子が含まれていることが判った。同様に検体 # 3 は、G T T
の変異遺伝子が、検体 # 4 では C G T の変異遺伝子が含まれている
ことが判った。

更に、上記表 5 に示した I N D E X 値と過剰度（標識標準 D N A :
非標識試料 D N A = 1 : 1 6 0 ）から上記表 1 に示した理論 I N D E X
値及び図 2 に示した検量線に基づいて変異遺伝子含量（正常遺伝子
中の変異又は多型遺伝子の存在率）を求めると、検体 # 2 では変異
遺伝子 G A T が約 7 %、検体 # 3 では変異遺伝子 G T T が約 2 . 5
%、検体 # 4 では変異遺伝子 C G T が約 2 0 % の含量で存在するこ
とが推定された。

[実施例 4]

ヒト染色体 N - r a s 遺伝子の 1 2 番目のコドンに関して、1 塩
基置換によって生じるアミノ酸置換をもたらす総ての遺伝子変異に
相当する標識標準 D N A を調製し、上記実施例 1 と同様の方法に従
って、遺伝子変異を検出、同定する方法について、以下に説明する。

正常な N - r a s 遺伝子の 1 2 番目のコドンは G G T (G l y)
であり、このコドンと 1 塩基置換によりアミノ酸置換をもたらすも
のとしては、A G T (S e r)、C G T (A r g)、T G T (C y s)、
G A T (A s p)、G C T (A l a)、及び G T T (V a l) の 6
種類が挙げられる。

プライマー

遺伝子増幅に用いるプライマーの塩基配列は以下に示す通りであ
る。

N - 1 2 S

配列番号 : 8

5' - A A C T G G T G G T G G T T G G A G C A - 3'

N - 1 2 A

配列番号：9

5' - G A T T G T C A G T G C G C T T T T C C C - 3'

標識標準DNAの調製

Takara社製のras Mutant set、N-ras
5 codon 12を用いて、野生型（GGT）、及び各変異遺伝子
に相当する合計7種類のフラグメントの1 pg / μ lの溶液を調製
した。この1 pgのフラグメントをテンプレートとして、上記プライ
マーを標識したBio-N-12A（100 ng）とDNPN-
12S（100 ng）を一对のプライマーとして用い、上記実施
10 例1と同様のPCR法により遺伝子増幅し、計7種類の標識標準DNA
を調製した。

非標識試料DNAの調製

一方、非標識DNAは上記の各変異遺伝子を含むフラグメントを
正常遺伝子（GGT）の塩基配列を持つものとそれぞれ混合し、正
15 常遺伝子99%と1%AGT変異遺伝子、正常遺伝子99%と1%
CGT変異遺伝子、正常遺伝子99%と1% TGT変異遺伝子、正
常遺伝子99%と1% GAT変異遺伝子、正常遺伝子99%と1%
GCT変異遺伝子、正常遺伝子99%と1% GTT変異遺伝子から
なる計6種類の微量変異遺伝子を含むテンプレートを調製した。

20 これらテンプレート溶液、及び100%正常遺伝子（GGT）を
有するフラグメント溶液を用いて、これらの1 pg / μ lをテンブ
レートとし、NH₂-N-12S（100 ng）とNH₂-N-12A
（100 ng）を一对のプライマーとして用い、上記実施例1と同
様のPCR法により遺伝子増幅し、計7種類の非標識試料DNAを
25 調製した。

コンペティティブハイブリダイゼーション

PCR反応液として、上記標識標準DNA 0.125 μ lに上記
各非標識試料DNA 20 μ l（160倍過剰量）を混合し、その他
の反応液組成及び条件は上記実施例1と同様にしてコンペティティ

ブハイブリダイゼーションを行った。この場合、対照として非標識試料DNAの代わりに水を用いて同様にコンペティティブハイブリダイゼーションを行った。

得られた反応液を25 μ l 分取し、ED-PCR法により再構成
 5 された標識標準DNA量を発色強度として測定した。結果を表6、
 7に示す。この場合、表6では、水を用いた場合に示した発色強度
 を100としたときの100分率（INDEX値）で示し、表7で
 は100%野生型遺伝子（GGT）を含む検体（normal）の
 示した発色強度を100とした場合の100分率（INDEX値）
 10 で示した。

表-6

標識標準 DNA	非 標 識 試 料 D N A							
	H ₂ O	normal	1% AGT	1% CGT	1% TGT	1% GAT	1% GCT	1% GTT
GGT	100.0	2.3	2.5	1.8	1.7	2.2	1.5	2.6
AGT	100.0	53.2	19.3	50.9	54.4	49.4	52.7	50.2
CGT	100.0	76.2	70.7	26.9	71.4	72.1	77.4	71.4
TGT	100.0	45.1	44.9	41.9	14.1	43.2	42.3	44.9
GAT	100.0	44.7	44.8	43.1	42.6	18.1	43.2	46.4
GCT	100.0	53.8	53.4	50.5	52.7	53.0	18.0	51.6
GTT	100.0	42.0	38.9	41.2	41.6	39.4	40.1	18.0

表-7

標識標準 DNA	非 標 識 試 料 D N A							
	H ₂ O	normal	1 % AGT	1 % CGT	1 % TGT	1 % GAT	1 % GCT	1 % GTT
GGT	-	-	-	-	-	-	-	-
AGT	-	100	36	96	102	93	99	94
CGT	-	100	93	35	94	95	102	94
TGT	-	100	100	93	31	96	94	100
GAT	-	100	100	96	95	41	97	104
GCT	-	100	99	94	98	99	34	96
GTT	-	100	93	98	99	94	95	43

表6の結果から明らかなように、1%AGT変異遺伝子を含む検体は、正常遺伝子GGT以外にAGT標識標準DNAに対しての発色強度の低下に伴いINDEX値が低い値となっており、それ以外の標識標準DNAに対してはINDEX値の低下は見られなかった。同様にそれぞれの変異遺伝子を微量に含む検体では、正常遺伝子GGTと相当する標識標準DNAに対してINDEX値が低くなっていることが認められた。

このように本発明の検査方法によれば、検体中に僅か数%程度しか含まれない微量変異遺伝子の検出、同定が可能であることが確認できた。

また、表7に示されているように、各検体の該当する標識標準DNAに対するINDEX値は31~43を示しており、表1に示した理論INDEX値及び図2に示した検量線から変異遺伝子の含有割合は1%程度であることが示され、実際の含有量とほぼ一致することが確認された。従って、上記方法によれば、遺伝子の変異又は多型

の定量を行うことも可能であることが確認された。

〔実施例 5〕

ヒト染色体 N-r a s 遺伝子の 61 番目のコドンに関して、1 塩基置換によって生じるアミノ酸置換をもたらす総ての遺伝子変異に
5 相当する標識標準 DNA を調製し、上記実施例 1 と同様の方法に従って、遺伝子変異を検出、同定する方法について、以下に説明する。

正常な N-r a s 遺伝子の 61 番目のコドンは C A A (G l n) であり、このコドンと 1 塩基置換によりアミノ酸置換をもたらすものとしては、A A A (L y s)、G A A (G l u)、C C A (P r o)、
10 C G A (A r g)、C T A (L e u)、C A C (H i s) 及び C A T (H i s) の 7 種類が挙げられる。

プライマー

遺伝子増幅に用いるプライマーの塩基配列は以下に示す通りである。

15 N - 61 S

配列番号：10

5' - G T T G G A C A T A C T G G A T A C A G C T - 3'

N - 61 A

配列番号：11

20 5' - G T C T C T C A T G G C A C T G T A C T C T - 3'

標識標準 DNA の調製

T a k a r a 社製の r a s M u t a n t s e t、N - r a s c o d o n 61 を用いて、野生型 (C A A) 及び各変異遺伝子に相当する合計 8 種類のフラグメントの 1 p g / μ l の溶液を調製した。この 1 p g のフラグメントをテンプレートとして、上記プライマーを標識した B i o - N - 61 A (100 n g) と D N P - N - 61 S (100 n g) を一対のプライマーとして用い、上記実施例 1 と同様の P C R 法により遺伝子増幅し、計 8 種類の標識標準 DNA を調製した。

非標識試料DNAの調製

一方、非標識DNAは上記各変異遺伝子を含むフラグメントを正常遺伝子(CAA)の塩基配列を持つものとそれぞれ混合し、正常遺伝子99%と1%AAA変異遺伝子、正常遺伝子99%と1%GAA
5 変異遺伝子、正常遺伝子99%と1%CCA変異遺伝子、正常遺伝子99%と1%CGA変異遺伝子、正常遺伝子99%と1%CTA変異遺伝子、正常遺伝子99%と1%CAC変異遺伝子、正常遺伝子99%と1%CAT変異遺伝子からなる計7種類の微量変異遺伝子を含むテンプレートを調製した。

10 これらテンプレート溶液及び100%正常遺伝子を有するフラグメント溶液を用いて、これらの1pg/μlをテンプレートとし、NH₂-N-61S(100ng)とNH₂-N-61A(100ng)を一对のプライマーとして用い、上記実施例1と同様のPCR法により遺伝子増幅し、計8種類の非標識試料DNAを調製した。

15 コンペティティブハイブリダイゼーション

PCR反応液として、上記標識標準DNA0.125μlに上記各非標識試料DNA20μl(160倍過剰量)を混合し、その他の反応液組成及び条件は上記実施例1と同様にしてコンペティティブハイブリダイゼーションを行った。なお、この際の温度勾配は89
20 ~78℃までを80分間かけて冷却した。この場合、対照として非標識試料DNAの代わりに水を用いて同様にコンペティティブハイブリダイゼーションを行った。

得られた反応液を25μl分取し、ED-PCR法により再構成された標識標準DNA量を発色強度として測定した。結果を表8、
25 9に示す。この場合、表8では、水を用いた場合に示した発色強度を100としたときの100分率(INDEX値)で示し、表9では100%野生型遺伝子(CAA)を含む検体(normal)の示した発色強度を100とした場合の100分率(INDEX値)で示した。

表-8

標識標準 DNA	非 標 識 試 料 D N A								
	H ₂ O	normal	1% AAA	1% GAA	1% CCA	1% CGA	1% CTA	1% CAC	1% CAT
CAA	100.0	4.7	2.3	1.0	1.6	2.7	0.3	1.4	1.9
AAA	100.0	55.0	19.7	55.1	54.9	51.1	53.3	54.7	52.5
GAA	100.0	61.3	60.9	24.5	57.4	57.8	60.5	58.1	60.4
CCA	100.0	51.1	48.3	49.1	17.1	52.4	49.1	50.1	52.5
CGA	100.0	45.6	44.4	42.9	42.7	18.7	43.7	43.1	47.2
CTA	100.0	38.3	37.6	37.0	37.5	35.8	14.2	37.3	36.5
CAC	100.0	57.6	58.3	56.0	54.9	57.3	60.0	23.6	55.7
CAT	100.0	42.4	41.3	40.3	41.8	40.6	41.7	41.6	16.1

表-9

標識標準 DNA	非 標 識 試 料 D N A								
	H ₂ O	normal	1% AAA	1% GAA	1% CCA	1% CGA	1% CTA	1% CAC	1% CAT
CAA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AAA	-	100	36	100	100	93	97	100	95
GAA	-	100	99	40	94	94	99	95	99
CCA	-	100	95	96	33	103	96	98	103
CGA	-	100	97	94	94	41	96	95	103
CTA	-	100	98	97	98	94	37	98	95
CAC	-	100	101	97	95	99	104	41	97
CAT	-	100	98	95	99	96	98	98	38

表 8 の結果から明らかなように、1 % A A A 変異遺伝子を含む検体は、正常遺伝子 C A A 以外に A A A 標識標準 D N A に対しての発色強度の低下に伴い I N D E X 値が低い値となっており、それ以外の標識標準 D N A に対しては I N D E X 値の低下は見られなかった。

同様にそれぞれの変異遺伝子を微量に含む検体では、正常遺伝子 C A A と相当する標識標準 D N A に対して I N D E X 値が低くなっていることが認められた。

このように本発明の検査方法によれば、検体中に僅か数 % 程度しか含まれない微量変異遺伝子の検出、同定が可能であることが確認できた。

また、表 9 に示されているように、各検体の該当する標識標準 D N A に対する I N D E X 値は 3 3 ~ 4 1 を示しており、表 1 に示した理論 I N D E X 値及び図 2 に示した検量線から変異遺伝子の含有割合は 1 % 程度であることが示され、実際の含有量とほぼ一致すること

が確認された。従って、上記方法によれば、遺伝子の変異又は多型の定量を行うことも可能であることが確認された。

以上説明したように、本発明の検査方法によれば、大量の正常遺伝子の中に、わずか1塩基相違する変異又は多型遺伝子が微量に存在する場合でも、これを確実に検出することができる上、従来困難であった、変異又は多型を示す遺伝子の同定、更には定量までも実現し得るものである。

また、本発明の検査キットによれば、本発明の検査方法に従って検体中の微量変異又は多型遺伝子を迅速に、簡単な操作で確実に実施することができる。

従って、本発明によれば、検体中に含まれる微量な遺伝子の変異又は多型を確実に検出することができる上、変異又は多型を示す遺伝子の同定、更には定量をも可能とするため、癌や特定のウィルス・細菌感染症の早期発見、診断・治療、及び骨髄移植の成否、拒絶反応の有無・程度等の判定などに計りしれない効果をもたらすものである。

請 求 の 範 囲

1. 検体中の目的核酸の特定領域を増幅して二本鎖の試料DNAを調製し、一方の鎖に固相担体と結合可能な部位を有し、かつ他方の鎖に検出可能な標識物を有した二本鎖核酸からなる標識標準DNAに、上記試料DNAを過剰量加えてコンペティティブハイブリダイゼーションを行い、その結果再構成された上記標識標準DNAを上記検出可能な標識物と固相担体に結合可能な部位とを利用して検出することによって上記試料DNAと上記標識標準DNAとの間で相補鎖の置換が生じた程度を測定することにより、上記試料DNA中に含まれる上記標識標準DNAと同一な検出対象DNAを検出する核酸の検査方法において、

上記試料DNA中に含まれる上記標識標準DNAと同一な検出対象DNAの検出限界を予め設定し、設定した検出限界に応じて上記コンペティティブハイブリダイゼーションの際に上記標識標準DNAに加える上記試料DNAの過剰度を設定することを特徴とする核酸の検査方法。

2. 試料DNA中に含まれる標識標準DNAと同一な検出対象DNAの検出限界がA/Bの場合に、試料DNAの過剰度をB/A倍以上とする請求の範囲第1項記載の核酸の検査方法。

3. 設定した試料DNAの過剰度における試料DNAと標識標準DNAとの間で相補鎖の置換が生じる程度の理論値から、試料DNA中に含まれる上記標識標準DNAと同一な検出対象DNAを定量する請求の範囲第1項又は第2項に記載の核酸の検査方法。

4. 目的核酸が癌関連遺伝子、遺伝病に関連する遺伝子、ウィルス遺伝子、細菌遺伝子、又は多型を有する宿主遺伝子由来のものである請求の範囲第1項乃至第3項のいずれか1項に記載の核酸の検査方法。

5. 目的核酸が癌関連遺伝子のk-ras遺伝子、N-ras遺伝子、p53遺伝子、BRCA1遺伝子、BRCA2遺伝子、又はAPC

遺伝子である請求の範囲第1項乃至第4項のいずれか1項に記載の核酸の検査方法。

5 6. 試料DNAが、一对のプライマーを用いて遺伝子増幅したものである請求の範囲第1項乃至第5項のいずれか1項に記載の核酸の検査方法。

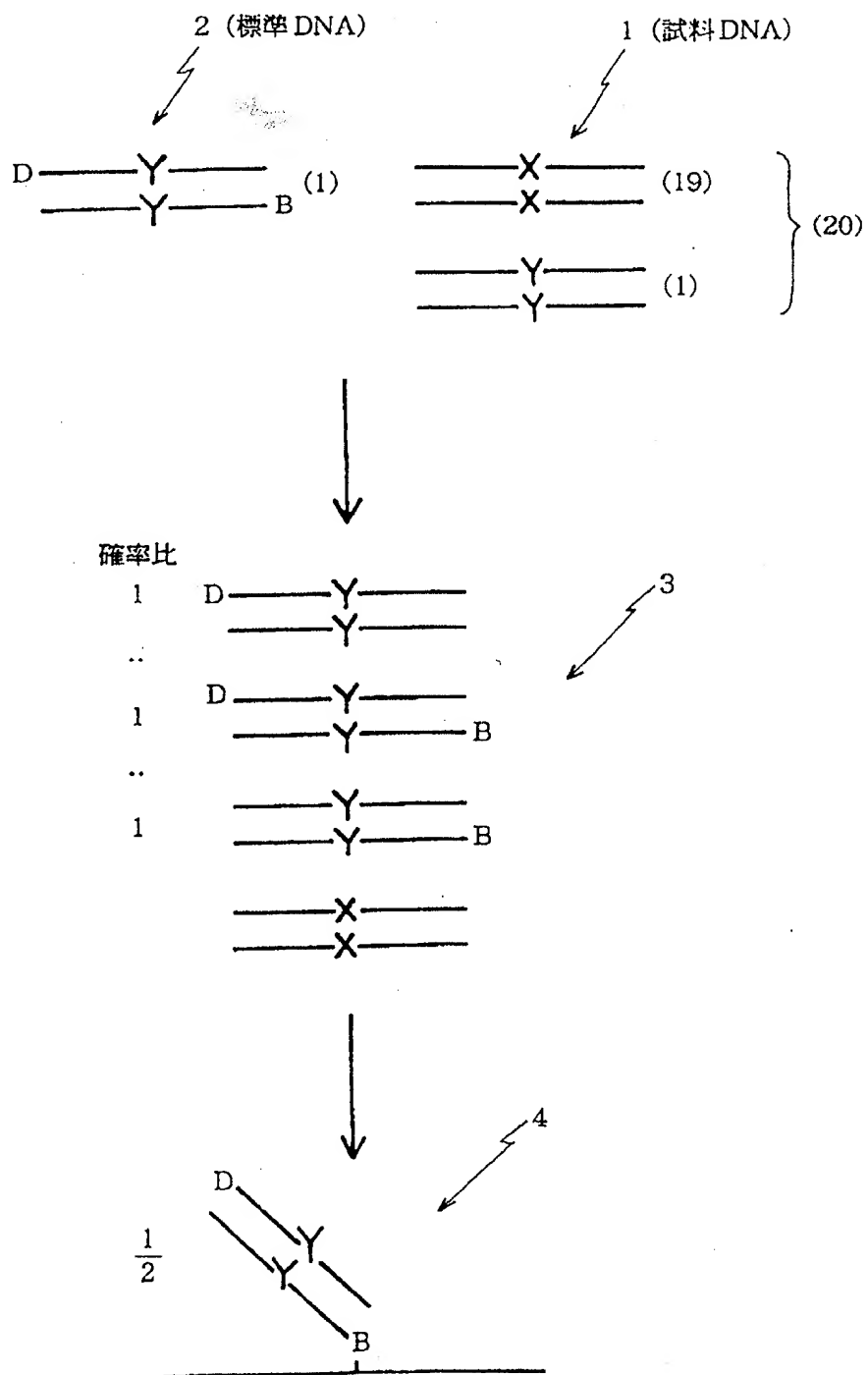
7. 標識標準DNAが、検出可能な標識物を導入したプライマーと、固相担体に結合可能な部位を導入したプライマーを用いて遺伝子増幅したものである請求の範囲第1項乃至第6項のいずれか1項に記載の核酸の検査方法。

10 8. 標識標準DNAが、化学合成により調製されたものである請求の範囲第1項乃至第6項のいずれか1項に記載の核酸の検査方法。

9. 請求の範囲第1項乃至第8項のいずれか1項に記載の方法に従って核酸の検査を行うための検査キットであって、一方の鎖に固相担体と結合可能な部位を有し、かつ他方の鎖に検出
15 可能な標識物を有した二本鎖核酸からなる標識標準DNAを具備してなることを特徴とする核酸の検査キット。

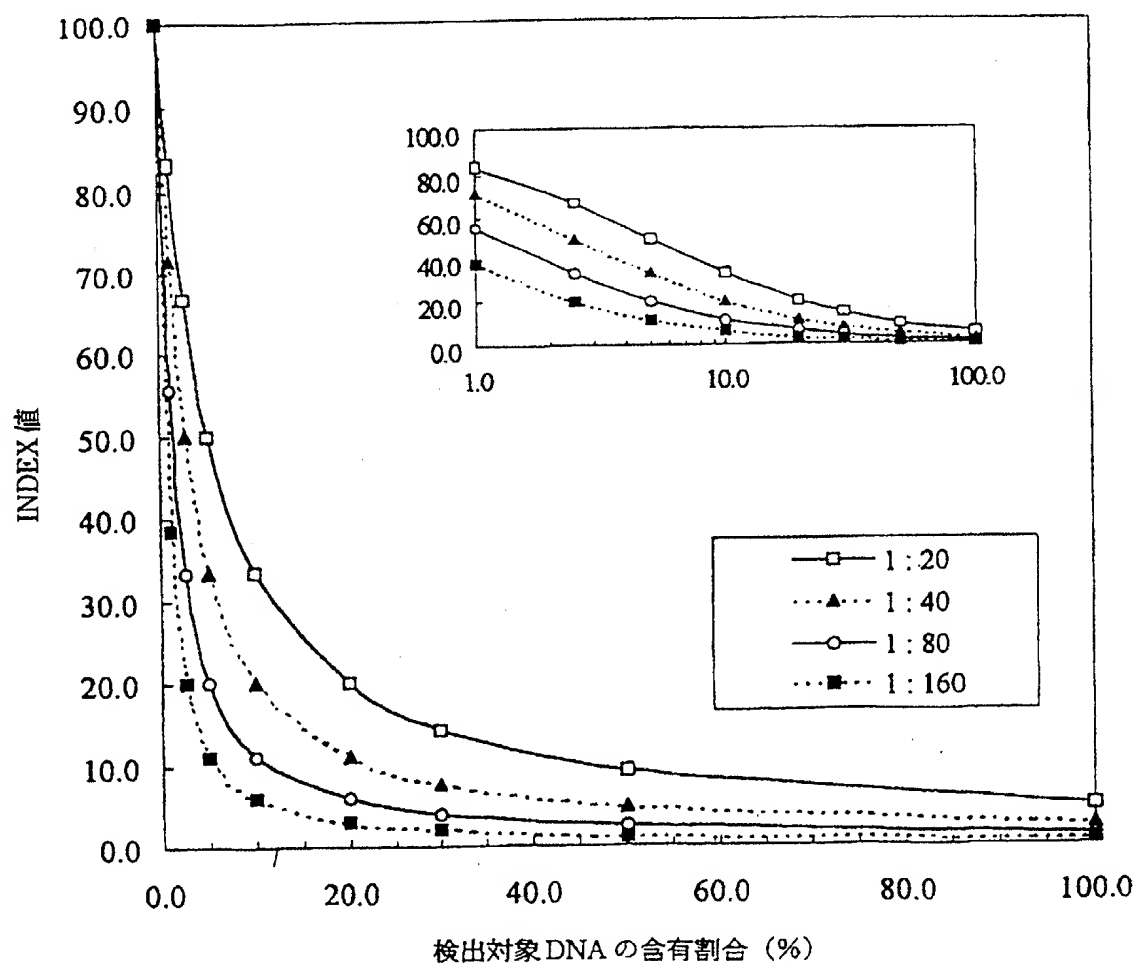
10. 検体中の目的核酸の特定領域を増幅するためのプライマーと、該プライマーを用いて検体中の目的核酸の特定領域を増幅して試料DNAを調製するための試料DNA増幅用試薬と、
20 ハイブリダイゼーション生成物をトラップするための担体と、ハイブリダイゼーション生成物を検出するための試薬とを具備した請求の範囲第9項記載の核酸の検査キット。

【図 1】



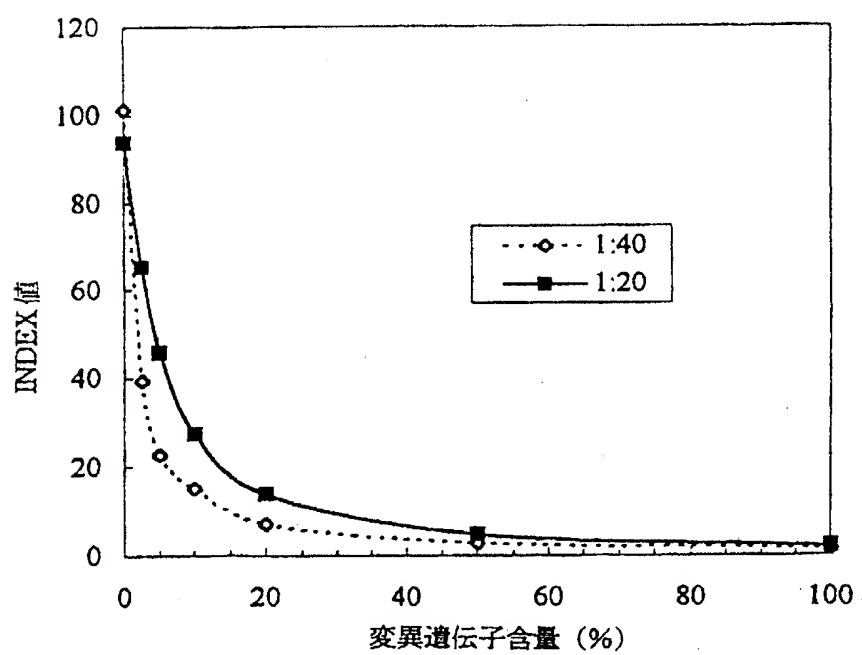
2 / 3

【図 2】



3 / 3

【図 3】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/02370

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12Q1/68, C12N15/11

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12Q1/68, C12N15/11

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

F-term BIOSIS WPI/WPI, L CAS ON LINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Anal. Biochem. 205(2) (1992) Terouanne B. et al. "Quantitative and qualitative analysis of amplified DNA sequences by a competitive hybridization assay" P. 193-199	1 - 10
Y	WO, 9502068, A (Wakunaga Seiyaku K.K.), January 19, 1995 (19. 01. 95) & EP, 664339, A	1 - 10
Y	Cancer Res. 51(13) (1991) Levi S. et al. "Multiple K-ras codon 12 mutations in cholangiocarcinomas demonstrated with a sensitive polymerase chain reaction technique" p. 3497-3502	4 - 10
Y	WO, 9113075, A (Orion Yhtymä Oy), September 5, 1991 (05. 09. 91) & JP, 5-504477, A & EP, 648280, A	4 - 10
Y	JP, 6-178700, A (Microgenics Corp.), June 28, 1994 (28. 06. 94)	1 - 10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
October 7, 1997 (07. 10. 97)

Date of mailing of the international search report
October 14, 1997 (14. 10. 97)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/02370

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& EP, 530998, A	
Y	JP, 5-184396, A (Advanced Skin Res. Kenkyusho K.K.), July 27, 1993 (27. 07. 93) (Family: none)	1 - 10
Y	"DNA Diagnosis -Clinical Application of Molecular Biology- (in Japanese)" edited by Takeo Endo (Nihon Rinshosha) (1989)p. 105-109	1 - 10

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP97/02370

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12Q1/68, C12N15/11

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12Q1/68, C12N15/11

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

F-term BIOSIS WPI/WPI.L CAS ON LINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Anal. Biochem. 205(2)(1992)Terouanne B. et al. 「Quantitative and qualitative analysis of amplified DNA sequences by a competitive hybridization assay」 P. 193-199	1-10
Y	WO, 9502068, A(WAKUNAGA SEIYAKU KK)19. 1月 1995(19. 01. 95) & EP, 664339, A	1-10
Y	Cancer Res. 51(13)(1991)Levi S. et al. 「Multiple K-ras codon 12 mutations in cholangiocarcinomas demonstrated with a sensitive polymerase chain reaction technique」 p. 3497-3502	4-10
Y	WO, 9113075, A(ORION YHTYMAE OY)5. 9月 1991(05. 09. 91) & JP, 5-504477, A & EP, 648280, A	4-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07. 10. 97

国際調査報告の発送日

14.10.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中 美奈子

4B

9359

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP. 6-178700, A (MICROGENICS CORP) 28. 6月 1994 (28. 06. 94) & EP. 530998, A	1-10
Y	JP. 5-184396, A (ADVANCED SKIN RES. KENKYUSHO KK) 27. 7月 1993 (27. 07. 93) (Family: none)	1-10
Y	遠藤武男編「DNA診断-分子生物学の臨床応用-」(日本臨牀社)(1989)p. 105-109	1-10